

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公開特許公報 (A)**

(11)特許出願公開番号

特開平8-34746

(43)公開日 平成8年(1996)2月6日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	府内整理番号	F I	技術表示箇所
A 61 K 47/26	B			
	C			
9/107	B			
9/127	F			

審査請求 未請求 請求項の数12 O L (全 10 頁)

(21)出願番号	特願平6-172912	(71)出願人	591243103 財団法人神奈川科学技術アカデミー 神奈川県川崎市高津区坂戸3丁目2番1号
(22)出願日	平成6年(1994)7月25日	(72)発明者	榎 源一郎 東京都世田谷区東玉川1-10-21
		(72)発明者	水野 伝一 神奈川県鎌倉市岡本1-21-20
		(74)代理人	弁理士 平木 祐輔 (外2名)

(54)【発明の名称】スフィンゴ糖脂質ミセルからなる薬物担体

(57)【要約】

【構成】ミセル状のスフィンゴ糖脂質からなる薬物担体及び該薬物担体を用いた医薬組成物、並びにそれらの製造法。

【効果】リポソームよりも容易に調製することができ、DDSに適用可能な薬物担体が提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ミセル状のスフィンゴ糖脂質からなる薬物担体。

【請求項2】 スフィンゴ糖脂質がガングリオシド、ラクトガングリオシド、グロボシド、イソグロボシド、ラクトシド及びネオラクトシドからなる群から選ばれる少なくとも1種である請求項1記載の薬物担体。

【請求項3】 スフィンゴ糖脂質を水又は水性媒体に添加し、ミセルを形成させることを特徴とする薬物担体の製造法。

【請求項4】 スフィンゴ糖脂質の有機溶媒溶液を水又は水性媒体に添加し、ミセルを形成させることを特徴とする請求項3記載の製造法。

【請求項5】 スフィンゴ糖脂質がガングリオシド、ラクトガングリオシド、グロボシド、イソグロボシド、ラクトシド及びネオラクトシドからなる群から選ばれる少なくとも1種である請求項3又は4記載の製造法。

【請求項6】 ミセル状のスフィンゴ糖脂質からなる薬物担体に薬物が封入されてなる医薬組成物。

【請求項7】 薬物が脂溶性物質又は両親媒性物質である請求項6記載の医薬組成物。

【請求項8】 スフィンゴ糖脂質がガングリオシド、ラクトガングリオシド、グロボシド、イソグロボシド、ラクトシド及びネオラクトシドからなる群から選ばれる少なくとも1種である請求項6又は7記載の製造法。

【請求項9】 スフィンゴ糖脂質及び薬物を水又は水性媒体に添加し、ミセルを形成させることを特徴とする医薬組成物の製造法。

【請求項10】 スフィンゴ糖脂質の有機溶媒溶液を水又は水性媒体に添加した後、薬物の有機溶媒溶液を添加し、ミセルを形成させることを特徴とする請求項9記載の製造法。

【請求項11】 薬物が脂溶性物質又は両親媒性物質である請求項9又は10記載の製造法。

【請求項12】 スフィンゴ糖脂質がガングリオシド、ラクトガングリオシド、グロボシド、イソグロボシド、ラクトシド及びネオラクトシドからなる群から選ばれる少なくとも1種である請求項9～11のいずれか1項に記載の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、スフィンゴ糖脂質ミセルからなる薬物担体及び該薬物担体を用いた医薬組成物、並びにそれらの製造法に関する。

【0002】

【従来の技術】 二重層ミセルであるリポソームは、薬物を特定の標的組織に送達するための担体として使用されている [D. A. タイレル、T. D. ヒース、C. M. コレイ及びB. E. ライマン (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 457, 259-302]。リポソームを薬物担体として使用する場合、慎重

に考慮されるべき因子は、その安定性、均一なサイズ、水溶性薬物の取り込み効率及び標的組織へのターゲッティングの効率である [P. R. クリス、M. J. ホープ、M. B. バリィ、T. D. マッデン、L. D. マイナー及びA. S. ジャノフ (1987) "Liposomes: From Biophysics to Therapeutics" (M. J. オストロ編集) 39～72頁、マルセル・デッカー、ニューヨーク；L. レーザーマン及びP. マティ (1987) "Liposomes: From Biophysics to Therapeutics" (M. J. オストロ編集) 157～194頁、マルセル・デッカー、ニューヨーク]。これらの中で、ターゲッティング効率が最も重要である。

【0003】 薬物送達に関する殆どの報告は、網内系細胞に富む肝臓及び脾臓以外の臓器にリポソーム封入薬物をターゲッティングすることを重要視している。肝臓をターゲッティングすることに関する二三の報告がなされている [D. A. タイレル、T. D. ヒース、C. M. コレイ及びB. E. ライマン (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 457, 259-302；J. C. ロジャース及びS. コーンフェルド (1971) *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 45, 622-629]。肝臓に達した後、殆どのリポソームがクッパー細胞に取り込まれ、これらの細胞により処理され、そしてそれらの限られた数が柔細胞に取り込まれる [D. A. タイレル、T. D. ヒース、C. M. コレイ及びB. E. ライマン (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 457, 259-302]。柔細胞へのリポソームの配向の効率を改良するために、リポソームサイズの減少 [Y. E. ラマン、E. A. セルニイ、K. R. パテル、E. H. ラウ及びB. J. ライト (1982) *Life Sciences* 31, 2061-2071] 及びそれらの変法 [A. スロリア及びB. K. バッチャワット (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 497, 760-765；S. ヨシオカ、Y. バンノ、K. オオキ、T. モリタ、Y. ミズカミ及びY. ノザワ (1986) *Yakuzaigaku* 46, 247-253] が試みられているが、その処理は複雑である。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 本発明は、リポソームよりも容易に調製することができ、薬物送達システム（以下「DDS」という。）に適用可能な薬物担体を提供することを目的とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、前述した目的を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、スフィンゴ糖脂質が均一なサイズの安定かつ小さい単層ミセルを容易に形成し、このスフィンゴ糖脂質ミセルが簡単な操作で脂溶性物質及び両親媒性物質を効率よく取り込み、保持することを見出した。これは、単層ミセルを形成するスフィンゴ糖脂質のような物質がDDSにおける担体として利用できることを示す。また、本発明者らは、静脈内注射後に、スフィンゴ糖脂質ミセルが肝臓中に急速に大量に蓄積し、そこに長期間停留することを見出した。これらの知見は、スフィンゴ糖脂質ミセルが肝臓配向担体として使用でき、新しいDDSを構築することを示す。

【0006】即ち、本発明は、以下の発明を包含する。

- (1) ミセル状のスフィンゴ糖脂質からなる薬物担体。
- (2) スフィンゴ糖脂質がガングリオシド、ラクトガングリオシド、グロボシド、イソグロボシド、ラクトシド及びネオラクトシドからなる群から選ばれる少なくとも1種である前記(1)に記載の薬物担体。

【0007】(3) スフィンゴ糖脂質を水又は水性媒体に添加し、ミセルを形成させることを特徴とする薬物担体の製造法。

(4) スフィンゴ糖脂質の有機溶媒溶液を水又は水性媒体に添加し、ミセルを形成させることを特徴とする前記

(3)に記載の製造法。

【0008】(5) スフィンゴ糖脂質がガングリオシド、ラクトガングリオシド、グロボシド、イソグロボシド、ラクトシド及びネオラクトシドからなる群から選ばれる少なくとも1種である前記(3)又は(4)に記載の製造法。

(6) ミセル状のスフィンゴ糖脂質からなる薬物担体に薬物が封入されてなる医薬組成物。

【0009】(7) 薬物が脂溶性物質又は両親媒性物質である前記(6)に記載の医薬組成物。

(8) スフィンゴ糖脂質がガングリオシド、ラクトガングリオシド、グロボシド、イソグロボシド、ラクトシド及びネオラクトシドからなる群から選ばれる少なくとも1種である前記(6)又は(7)に記載の製造法。

(9) スフィンゴ糖脂質及び薬物を水又は水性媒体に添加し、ミセルを形成させることを特徴とする医薬組成物の製造法。

【0010】(10) スフィンゴ糖脂質の有機溶媒溶液を水又は水性媒体に添加した後、薬物の有機溶媒溶液を添加し、ミセルを形成させることを特徴とする前記(9)に記載の製造法。

(11) 薬物が脂溶性物質又は両親媒性物質である前記(9)又は(10)に記載の製造法。

【0011】(12) スフィンゴ糖脂質がガングリオシド、ラクトガングリオシド、グロボシド、イソグロボシド、ラクトシド及びネオラクトシドからなる群から選ばれる少なくとも1種である前記(9)～(11)のいずれかに記載の製造法。

本発明に用いるスフィンゴ糖脂質としては、スフィンゴイド(炭素数16～20の長鎖アミノアルコール)を含む糖脂質であれば特に制限はなく、例えばガングリオシド、ラクトガングリオシド、グロボシド、イソグロボシド、ラクトシド、ネオラクトシド、好ましくはガングリオシドが挙げられる。また、ガングリオシドとしては、例えばG_{M1}、G_{M2}、G_{M3}、G_{M4}、G_{D1a}、G_{D1b}、G_{T1}、G_{T1b}、G_{T1c}が挙げられる。本発明において、前記スフィンゴ糖脂質は単独又は混合物として用いられる。

【0012】本発明の薬物担体は、スフィンゴ糖脂質を水又は水性媒体に添加し、ミセルを形成させることによ

り容易に調製することができる。本発明の医薬組成物は、スフィンゴ糖脂質及び薬物を水又は水性媒体に添加し、ミセルを形成させることにより容易に調製することができる。この際、スフィンゴ糖脂質は、好ましくは、クロロホルム、メタノール、エタノール、ピリジン、テトラヒドロフラン、ジメチルホルムアミド、石油エーテル、温エーテル等の有機溶媒、もしくはクロロホルムと同程度の極性を有する他の有機溶媒、又はこれらの混合溶液に溶解して水又は水性媒体に添加する。前記水性媒体としては、例えば生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩液等が挙げられる。

【0013】本発明の薬物担体に封入する薬物としては、脂溶性物質又は両親媒性物質であれば特に制限はないが、本発明の薬物担体は肝臓を標的臓器とするので、好ましくは、ドキソルビシン、エトポシド、フルオロウラシル等の抗腫瘍剤が挙げられる。本発明における薬物担体と封入薬物の比率は、ミセルを形成する際の両者の配合割合を変えることにより適宜調整することができる。

【0014】スフィンゴ糖脂質は元来生体の抗生物質であり、血液中にも存在することから安全性は高い。大量の投与の場合、副作用として予想される補体の副経路に対する活性化は、10mg/kg程度までの投与であれば認められないと考えられる。従って、スフィンゴ糖脂質としての好ましい投与量は0.1～10mg/kgである。本発明の医薬組成物は、通常、静脈内投与、動脈内投与により投与される。

【0015】

【実施例】以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明の範囲は以下の実施例に限定されるものではない。

【0016】(実施例1)

(1) 材料及び方法

(a) 材料

スフィンゴ糖脂質としてウシ脳ガングリオシドを使用した。ガングリオシド混合溶液は和光純薬工業(株)から購入した。ガングリオシドG_{M1}はシグマ・ケミカル社(セントルイス、MO)から購入した。卵ホスファチジルコリン(PC)はアバンチ・ポーラーリピッズ(アラバスター、AL)から入手した。コレステロールはヌ・チェック・プレプ(エリシアン、MN)から入手した。ラウリル硫酸ナトリウム(SDS)はナカライ・テスク社から入手した。スーダンIIIを和光純薬工業(株)から入手した。ドキソルビシン塩酸塩は協和醸酵工業(株)により供給された。[³H]コレステリルヘキサデシルエーテルはデュポンNENリサーチ・プロダクツ(ボストン、MA)から入手した。

【0017】(b) マウス

6週齢の近交系雄C3H/Heマウスを静岡実験動物飼育場から入手した。

(c) ガングリオシド濃度の測定

ガングリオシドのモル濃度は、レゾルシノール-HCl法 [K.スズキ (1964) *LifeSci.*, 1227-1233] によりシアル酸濃度を測定することにより測定した。

【0018】 ガングリオシド混合溶液のモル濃度は、以下のようにして算出した。ウシ脳ガングリオシド製剤中のガングリオシドの4種の主成分はG_{M1} (21%)、G_{D1a} (40%)、G_{D1b} (16%) 及びG_{T1b} (19%) である [J. C. サムソン (1986) *Drugs of Today*, 73-107]。この比に基いて、溶液中 5 mg/ml でのガングリオシドのモル濃度は約2.5 mMであると算出され、そしてそのシアル酸濃度は4.8 mMであると算出された。観察されたシアル酸濃度は、計算値とよく一致して5.2 mMであった。

【0019】 (d) スーダンIII 濃度の測定

それぞれの試験試料のアリコット (0.5ml) を蒸発乾固させた後、クロロホルム 1 mlを添加した。その溶液を室温で15分間にわたって浴型音波処理装置 (シバタSU-9TH) で音波処理し、そして4℃で10分間にわたって1,900gで遠心分離した。上清を集め、0.45 μm のフィルター (ゲルマン・サイエンシズ、エキクロディスク25CR) で濾過した。濾液の511nm における吸光度を測定した。クロロホルム中の10 μM のスーダンIII の511nm における吸光度は0.280 であった。

【0020】 (e) ドキソルビシン濃度の測定

ドキソルビシン濃度はペーチャーらの方法 [N.R. ペーチャー、A.L. ムーア、J.G. ベルンシュタイン及びA.リウ (1970) *Cancer Chemotherapy Reports*パート1 54, 89-94] に実質的に従って測定した。簡単にいえば、試料溶液を50%エタノール中の0.3N塩酸で20倍に希釈し、蛍光強度を日立F-4010蛍光分光光度計 (470nmの励起波長; 585nm の発光波長) で測定した。

【0021】 (f) ゲル濾過

ガングリオシドG_{T1b} の生理食塩水溶液0.5 mlを、生理食塩水で平衡化したセファロース6B (カラムサイズ、1cm x 7.5cm ; 床容積、5.9 ml) に適用した。それを生理食塩水で溶出させ、0.5 ml/画分を集めた。ガングリオシド濃度を前記のようにして測定した。SDS の場合、セファデックスG-25のカラムを使用し、SDS を蒸留水で溶出させた。SDS 濃度を236nm で分光光度計で測定した。

【0022】 (g) 薬物封入のためのガングリオシドミセルの調製

ガングリオシド混合物及びガングリオシドG_{M1}をクロロホルム/メタノール(1:1, v/v)に溶解した。ガングリオシド混合物/ガングリオシドG_{M1} (モル比、2:1)を使用してガングリオシドミセルを調製した。ガングリオシド混合物を蒸発乾固させ、生理食塩水を添加してガングリオシド濃度を50 μM とした。その溶液を浴型音波処理装置で室温で1時間にわたって音波処理し、遠心分離し、そして上清を集め、0.2 μm のフィルター (ゲルマン・サイエンシズ、No. 4192) で濾過した。

【0023】 (h) リポソームの調製

卵PC及びコレステロールをクロロホルムに溶解し、リポソームを卵PC/コレステロール (モル比、2:1)で調製した。この混合物を蒸発乾固させ、生理食塩水を添加して卵PC濃度を2.5 mMとした。その溶液をホルン型音波処理装置 (ブランソン250型 Sonifier、出力制御2、負荷サイクル25%) で室温で20分間にわたって音波処理し、遠心分離し、そして上清を集め、0.45 μm のフィルター (ゲルマン・サイエンシズ、No. 4184) で濾過した。PC濃度を和光純薬工業 (株) 製のリン脂質B-test Wakoの分析キットにより測定した。

【0024】 (i) ガングリオシドミセル及びリポソームへのスーダンIII 及びドキソルビシンの封入

クロロホルムに溶解した種々の量のスーダンIII 又はメタノールに溶解した種々の量のドキソルビシンをガングリオシドのクロロホルム/メタノール(1:1, v/v)溶液、又は卵PC/コレステロールのクロロホルム溶液に添加した。ガングリオシドミセル又はリポソームをつくった後、これらの溶液を前記のようにして個々に濾過し、そしてガングリオシド、卵PC、スーダンIII 及びドキソルビシンの濃度を測定した。ドキソルビシン封入の場合、濃度を測定する前に、その溶液をセファデックスG-50カラムに通して遊離ドキソルビシンを除去した。

【0025】 (j) ガングリオシドミセル及びリポソーム中に封入されたスーダンIII 及びドキソルビシンの保持

凍結-解凍実験において、10倍モル過剰のスーダンIII をガングリオシド混合物のクロロホルム/メタノール (1:1, v/v)溶液、及び卵PC/コレステロールのクロロホルム溶液に添加し、ガングリオシドミセル及びリポソームをつくった。それぞれの試料の半分を-80℃で1時間凍結し、次に室温で30分間保った。解凍溶液を濾過し、そしてガングリオシド、卵PC及びスーダンIII の濃度を測定した。ドキソルビシンの場合、5倍モル過剰のドキソルビシンをガングリオシド混合物のクロロホルム/メタノール(1:1, v/v)溶液に添加し、そして卵PCに対し2.5倍モル過剰のドキソルビシンを卵PC/コレステロールのクロロホルム溶液に添加した。凍結、解凍後に、放出されたドキソルビシンを分離し、そして前記のようにして測定した。

【0026】 希釈実験において、スーダンIII 封入ガングリオシド混合物及びリポソームのそれぞれの試料の半分を生理食塩水で5倍に希釈し、室温で1時間保った。希釈溶液を濾過し、そしてガングリオシド、卵PC及びスーダンIII の濃度を測定した。ドキソルビシンの場合、5倍モル過剰のドキソルビシンをガングリオシド混合物に添加し、そして卵PCに対し2.5倍モル過剰のドキソルビシンを卵PC/コレステロールに添加した。希釈後、放出ドキソルビシンの濃度を測定する前に、放出ドキソルビシンをセントリサート (Centrisart) (分子量カットオ

フ20,000、サルトリアス)による限外濾過により封入物から分離した。

【0027】ドキソルビシンの漏出に対するヒト血清の効果を知るために、ドキソルビシン封入ガングリオシドミセル及びリポソームを、前記のようにしてつくった。それらを5℃又は37℃でヒト血清(最終血清濃度、25%)の存在下で16時間インキュベートした。インキュベーション後に、放出ドキソルビシンを分離し、そして前記のようにして測定した。

【0028】(k) ガングリオシドG_{M1}によるドキソルビシン封入ガングリオシドミセル及びリポソームの臓器分布

ドキソルビシン封入ガングリオシドミセル及びリポソームを、わずかに変更して実質的に前記のようにしてつくった。5倍モル過剰のドキソルビシン及び痕跡量の[³H]コレステリルヘキサデシルエーテルをガングリオシド混合物のクロロホルム/メタノール(1:1, v/v)溶液に添加した。リポソームの場合、卵PCに対し等モル量のドキソルビシン、卵PCに対し0.1モル量のガングリオシドG_{M1}及び痕跡量の[³H]コレステリルヘキサデシルエーテルを卵PC/コレステロールのクロロホルム溶液に添加した。ガングリオシドミセル又はリポソームをつくった後、それらを濾過したが、セファデックスG-50カラムに通さなかった。それらをマウスに静脈内投与し(0.2ml/マウス)、血液を集め、そして示された時間で約10mlの生理食塩水による灌流後に4種の臓器(肝臓、脾臓、肺及び脳)を切除した。

【0029】血液試料(0.2ml)を100mMのEDTA三ナトリウム塩水溶液10μl及びソルバブル(Solvable)(デュポンNENリサーチ・プロダクツ)1.0mlと共に50℃で1時間インキュベートし、次に100mMのEDTA三ナトリウム塩水溶液0.1ml及び30%過酸化水素水0.3mlを添加した。それらを50℃で更に1時間インキュベートし、室温に冷却し、次にアトムライト(Atomlight)(デュポンNENリサーチ・プロダクツ)10mlを添加した。試料を浴型音波処理装置で音波処理して血液を完全に可溶化し、そして放射能をアロカ(Aloka)LSC-3500シンチレーションカウンターで測定した。

【0030】臓器の場合、それら(50mg)を50℃で3時間以上にわたってソルバブル(Solvable)0.5mlと共にインキュベートし、次に30%過酸化水素水0.15mlを添加した。それらを室温で1時間保ち、次にアトムライト(Atomlight)10mlを添加した。試料を浴型音波処理装置で音波処理して臓器を完全に可溶化し、そして放射能を測定した。

【0031】(2) 結果

(a) ゲル濾過により調べたガングリオシドG_{T1b}によるミセルの形成
種々の濃度におけるガングリオシドミセルの安定性をゲル濾過により調べた。ガングリオシドG_{T1b}を超音波処

理しないで生理食塩水に溶解した。ガングリオシドG_{T1b}のみからなるミセルは試験した全ての濃度で單一ピークを示し、溶出プロフィールは同じであり、ミセルがガングリオシド濃度にかかわらず安定であることを示した(図1a)。見掛分子量を計算したところ、約250kDであった。SDSはミセルを形成することが知られているが、見掛分子サイズは試験した異なる濃度で異なっていた(図1b)。

【0032】(b) ゲル濾過により調べたガングリオシド混合物によるミセルの形成

次に、経済的な観点から、本発明者らはゲル濾過により市販のガングリオシド混合物の安定性を調べた。その混合物を超音波処理しないで生理食塩水に溶解した。ガングリオシドの見掛分子サイズは試験した種々の濃度で異なっており、市販のガングリオシド混合物がその不安定性のために薬物担体として使用できないことを示した(図2)。

【0033】リポソームへの純粋なガングリオシドG_{M1}の挿入は網内系によるリポソーム取り込みを減少させることが知られている[T.M.アレン、C.ハンセン及びJ.ルートレッジ(1989) *Biochim.Biophys.Acta* 981, 27-35]。それゆえ、ゲル濾過をガングリオシドG_{M1}と混合した市販のガングリオシド混合物について行った。100μMの市販のガングリオシド混合物と50μMのガングリオシドG_{M1}の混合物(モル比、2:1)は安定なミセルを生じた(図3)。夾雜物であるコレステロール及びリンは検出限界以下であった。

【0034】それゆえ、経済的な観点及び、薬物担体としての安定性から、市販のガングリオシド混合物とガングリオシドG_{M1}の混合物(モル比、2:1)は今まで試験した中で最良の組み合わせであるといえる。

【0035】(c) リポソームと比較してのガングリオシドミセルへの薬物の封入

ガングリオシドミセルへの薬物の封入の効率を調べた。スーダンIIIを、その高い疎水性のために選択し、そしてガングリオシドミセル又はリポソームへのその封入を調べた。「(1) 材料及び方法」の項に記載されたように、0.45μmのフィルターを通過するのに充分なようにリポソームの粒子サイズを減少するために、ガングリオシドミセルと比較して更に大きな超音波処理出力がリポソームにつき必要であった。ガングリオシド100分子当たり約13分子のスーダンIIIをガングリオシドミセルに最大に封入し、そしてPC100分子当たり約6分子のスーダンIIIをリポソームに最大に封入した。これは、ガングリオシドミセルへのスーダンIIIの封入の最大の効率がリポソームへのスーダンIIIの封入の最大の効率の約2倍であることを示す(図4)。

【0036】両親媒性の抗腫瘍剤であるドキソルビシンを一般的薬物として選択した。ガングリオシド100分子当たり約20分子のドキソルビシンをガングリオシドミセ

ルに最大に封入し、そしてPC100 分子当たり約4分子のドキソルビシンを最大に封入し、ガングリオシドミセルへのドキソルビシンの封入の最大の効率がリポソームへのドキソルビシンの封入の最大の効率の約5倍であることを示した(図5)。

【0037】(d) ガングリオシドミセル中及びリポソーム中の封入薬物の保持

* 【表1】

ガングリオシドミセル及びリポソームからのスーダンIII
及びドキソルビシンの漏出に対する凍結及び解凍の効果

担体	スーダンIII		ドキソルビシン
	漏出率(%)	漏出率(%)	漏出率(%)
ガングリオシドミセル	13	6	
リポソーム	0	18	

薬物保持に対する希釈の効果を調べた(表2)。スーダンIIIを使用した場合、リポソームはガングリオシドミセルよりも有効に薬物を保持し、一方、ガングリオシドミセルはリポソームよりも有効にドキソルビシンを保持※

ガングリオシドミセル及びリポソームからのスーダンIII
及びドキソルビシンの漏出に対する希釈の効果

担体	スーダンIII		ドキソルビシン
	漏出率(%)	漏出率(%)	漏出率(%)
ガングリオシドミセル	32	16	
リポソーム	20	21	

薬物保持に対するヒト血清の効果を検討した結果、ガングリオシドミセル及びリポソームが25%のヒト血清の存在下の37°Cで16時間のインキュベーション後に最初に封入された薬物の90%以上を保持することが示された(表3)。

【0040】

【表3】

ガングリオシドミセル及びリポソームからのドキソルビシンの漏出に対するヒト血清の効果

温 度 (°C)	ドキソルビシンの漏出率(%)	
	ガングリオシド ミセル	リポソーム
5	9	9
37	9	8

【0041】(e) ガングリオシドG₁₁によるドキソルビシン封入ガングリオシドミセル及びリポソームの臓器分布

臓器中のガングリオシドミセル及びリポソームの分布を、トレーサーとして³Hコレスチリルヘキサデシルエーテル [J.T.P. デルクセン、H.W.M. モーセルト及びG.L. シエルホフ (1987) *Biochim. Biophys. Acta* 931, 33-40]を使用して調べた。

【0042】全回収率は最初の放射能に対する血液及び4種の臓器から回収された放射能の合計の比と称されることを考慮して、ガングリオシドミセルからの全回収率(81~99%)はリポソームからの全回収率(42~58%)よりも高かった(図6a)。ガングリオシドミセルの場

*封入薬物の保持の安定性を調べ、そして薬物保持に対する凍結及び解凍の効果を調べた(表1)。スーダンIIIを使用した場合、リポソームはガングリオシドミセルよりも有効に薬物を保持し、一方、ガングリオシドミセルはリポソームよりも有効にドキソルビシンを保持した。

【0038】

* 【表1】

ガングリオシドミセル及びリポソームからのスーダンIII
及びドキソルビシンの漏出に対する凍結及び解凍の効果

担体	スーダンIII		ドキソルビシン
	漏出率(%)	漏出率(%)	漏出率(%)
ガングリオシドミセル	13	6	
リポソーム	0	18	

※した。

【0039】

* 【表2】

ガングリオシドミセル及びリポソームからのスーダンIII
及びドキソルビシンの漏出に対する希釈の効果

担体	スーダンIII		ドキソルビシン
	漏出率(%)	漏出率(%)	漏出率(%)
ガングリオシドミセル	32	16	
リポソーム	20	21	

合、静脈内注射後30分で最初の放射能の約60%が肝臓中で回収され、24時間で79%が回収された。しかしながら、リポソームの場合、静脈内注射後30分で最初の放射能のわずかに約7%が肝臓中で回収され、24時間で48%が回収された(図6a)。その他の臓器、脾臓、肺及び脳中の放射能の蓄積においてガングリオシドミセルとリポソームの間に顕著な相違はなかった(図6b)。

【0043】(3) 検討

薬物担体としてミセルを使用しようとする試みは、二重層ミセル(ラメラ)を形成するリポソームの使用に制限されていた[D.A. タイレル、T.D. ヒース、C.M. コレイ及びB.E. ライマン (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 457, 259-302]。SDSのような界面活性剤による単層ミセルは色素を取り込むことが知られているが[K. スズキ (1964) *Life Sci.*, 1227-1233]、薬物担体としての単層ミセルの使用に関する報告はなかった[D.A. タイレル、T.D. ヒース、C.M. コレイ及びB.E. ライマン (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 457, 259-302]。本発明は、ガングリオシド等のスフィンゴ糖脂質の単層ミセルが安定な、小さいサイズの肝臓配向薬物担体として使用し得ることを初めて示したものである。

【0044】単層ミセルは、その低い保持能力及びミセルの不安定性のために薬物担体として適しないように思われる。しかしながら、単層ミセルは、その見掛けサイズがリポソームの見掛けサイズより小さくこと、及びその臨界ミセル濃度(cmc)より上で自然に形成される凝集物が均一のサイズのものであること[K. シノダ (1963) "Col-

loidal Surfactants: Some Physicochemical Properties" (K. シノダ、T. ナカガワ、B. タマムシ及びT. イセムラ編集) 1-96頁, アカデミック・プレス、ニューヨーク] の点でリポソームに対し利点を有する。リポソームはSDSのような通常の単層ミセルよりも安定であることが知られているが、そのサイズ不均一性は不利である。

【0045】ガングリオシドのcmcは分子種にかかわらず約70~100 μMであることが報告されている [H.C. ヨーへ及びA. ローゼンベルグ (1972) *Chem. Phys. Lipids* 9, 279-294]。図1aは、ガングリオシドミセルの見掛け分子サイズがガングリオシドのcmcの上下の両方で同じであったことを示す。これは、ガングリオシドが、それぞれのセラミド鎖に結合している一つ以上のシアル酸を伴う分枝した糖網状構造により囲まれた球形の疎水性形態の小さく、かつ均一なミセルを形成することを示す。SDSのcmcは約8 mMであると報告されている [K. シノダ (1963) "Colloidal Surfactants: Some Physicochemical Properties" (K. シノダ、T. ナカガワ、B. タマムシ及びT. イセムラ編集) 1-96頁, アカデミック・プレス、ニューヨーク]。図1bは100 mMで单一ピークの存在を示し、6 mM及び4 mMの両方で最初のものよりも低い分子量に相当する付加的なピークを有し、これは見掛け分子サイズがSDS濃度に応じて変化することを示す。これらの結果から、ガングリオシドミセルはSDSミセルよりも安定であり、そして薬物担体として利用できるといえる。

【0046】図1aに示す結果に基いて、本発明者は、ガングリオシドミセルが集まって約120のガングリオシド分子からなる球形の形態を形成するものと推定した。何となれば、その見掛け分子量は約250kDであり、その疎水性部分が直径約4 nmであるからである。薬物担体としてしばしば使用されるマルチラメラ・リポソームは、通常の分散方法 [F. オルソン、C.A. フント、F.C. アゾカ、W.J. ベイル及びD. パパハジョボウラス (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 557, 9-23] により直径0.1 μm ~ 3 μmの範囲の不均一な小胞として得られる。大きいリポソームは網内系により容易に捕捉されると報告されている [Y.E. ラマン、E.A. セルニイ、K.R. パテル、E.H. ラウ及びB.J. ライト (1982) *Life Sciences* 31, 2061-2071]。こうして、均一なサイズを有するガングリオシドミセルは、後に説明されるようにリポソームよりも優れているといえる。

【0047】経済的な観点から、市販のガングリオシド混合物の安定性を調べた。その混合物により形成されたミセルはサイズが小さかったが、単一のガングリオシド種G_{D1a}により形成されたミセルよりも安定ではなかった (図2)。市販のガングリオシド混合物により形成されたミセルの不安定性が複数のガングリオシド種の混合に起因するか否かを知るために、市販のガングリオシド混合物の主成分である4種の純粋なガングリオシド (G_{D1a}、G_{D1b}、G_{T1b}、G_{M1}) の混合物を使用してゲル

濾過を行った。その結果、濃度にかかわらず单一ピーク及び同じ溶出プロフィールを示した (図7)。それゆえ、市販のガングリオシド混合物と4種の純粋なガングリオシドの混合物の安定性の相違は前者中の汚染の存在のためであろうことが示唆される。市販のガングリオシド混合物のミセルにおけるこの不安定性は、2対1のモル比のガングリオシドG_{M1}の添加により簡単に解決し得る (図3)。

【0048】両親媒性抗腫瘍剤であるドキソルビシン (これはその分子中の糖及び疎水性部分の存在のために若干嵩高であり、そしてサイズが約0.7 nm x 1.2 nmである) の封入につき、ガングリオシドミセルがリポソームよりも約5倍有効であるという事実に注目する必要がある (図5)。この事実は、リポソームがスーザンIIIのような脂溶性物質を優先的に保持し、一方、ガングリオシドミセルがドキソルビシンのような両親媒性物質を優先的に保持することを示す (表1、2)。ガングリオシドミセルは、分子中に或る種の嵩高の疎水性部分を有する薬物を封入し得る。ガングリオシドミセルがスーザンIIIよりもドキソルビシンを有効に封入する理由は、以下のように説明し得る。ドキソルビシンのアントラキノン部分がガングリオシド分子のセラミド部分と会合し、同時に、ドキソルビシンの親水性部分であるヘキソース部分が水素結合によりその分子の糖部分と結合する。

【0049】封入薬物を含むガングリオシドミセルは、凍結及び解凍、並びに希釀に対して耐性であった (表1、2)。また、それはリポソームと同様に有効にヒト血清の存在下でドキソルビシンを保持する (表3)。これらの結果は、ガングリオシドミセルが薬物の封入後でさえもその物理的安定性を保持することを示す。ターゲッティングに関して、ガングリオシドミセルはその静脈内投与後直ちに肝臓中に蓄積し、その後、その蓄積量がわずかに増加する (図6a)。ガングリオシドミセルからの放射能の全回収率 (81~99%) はリポソームからの全回収率 (42~58%) よりも高かった (図6a)。これらの結果は、ガングリオシドミセルが肝臓を標的臓器とする薬物担体として有用であることを示す。肝臓細胞は柔細胞と非柔細胞からなる。小さいリポソームが柔細胞により容易に捕捉されるという知見 [Y.E. ラマン、E.A. セルニイ、K.R. パテル、E.H. ラウ及びB.J. ライト (1982) *Life Sciences* 31, 2061-2071]、及び肝臓内皮細胞の間の窓のサイズが約100 nmであり [E. ウィッセ、R. デ・ザンガー及びR. ジャコンズ (1982) "Sinusoidal Liver Cells" (D.L. ノーク及びE. ウィッセ編集) 61-67頁、エルセビア・バイオメディカル・プレス、アムステルダム]、そして薬物がこれらの間隙を通過する必要があるという結果に基いて、ガングリオシドミセルは、リポソーム及び窓のいずれよりも小さいので、柔細胞に容易に到達し得るといえる。ガラクトースのレセプターが柔細胞について報告されている [A.G. モレル、R.A. イル

ビン、I. シュテルンリープ及びI. H. シャインベルグ(1968) *J. Biol. Chem.* 243, 155-159; H. H. スパンジャー及びG. L. シェルホフ (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 734, 40-47]。ガングリオシドミセル中のガングリオシドG_{M1}分子及びG_{T1b}分子の両方の非還元性末端にあるガラクトース残基はまた柔細胞によるミセルの捕捉に関与し得る [A. スロリア及びB. K. パッチハワット (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 497, 760-765]。

【0050】ガングリオシドミセルの臨床上の応用について、二つの問題に注意を払う必要がある。第一の問題は、ガングリオシドがヒトの補体活性化経路の副経路を活性化することである [H. オオシマ、G. ソマ及びD. ミズノ (1993) *Int. Immunol.* 5, 1349-1351]。第二の問題は、運動神経障害を伴うギラン-バレー症候群がガングリオシド摂取後に生じることである [N. ユウキ、T. タキ、F. イナガキ、T. カサマ、M. タカハシ、K. サイトウ、S. ハンダ及びT. ミヤタケ (1993) *J. Exp. Med.* 178, 1771-1775]。前者の問題は、ガングリオシド濃度を調節することにより解決し得る。ヒトの副経路は、50 μM 未満の濃度でガングリオシドにより活性化されない [H. オオシマ、G. ソマ及びD. ミズノ (1993) *Int. Immunol.* 5, 1349-1351]。後者の問題は、組織適合性抗原HLA-B35 を有する男性及び女性へのガングリオシドの投与を避けることにより解決し得る。その疾患とこの抗原との間に統計上有意な関連があるからである [N. ユウキ、S. サトウ、T. イトウ及びT. ミヤタケ (1991) *Neurology* 41, 1561-1563]。

【0051】結論として、本発明者らは、ガングリオシド等のスフィンゴ糖脂質のミセルがその調製の容易なこと、その小さく、かつ均一なサイズ、並びにある程度嵩高の分子を封入し、保持する際の高い効率の結果として、薬物担体としてリポソームより優れていることを最初に実証した。また、本発明者らは、ガングリオシド等のスフィンゴ糖脂質が肝臓配向薬物担体として有用であることを実証した。

【0052】(試験例1) 急性毒性試験

マウス (C 3 H/He) 5匹にドキソルビシンとして 2 μg を含有するガングリオシドG_{M1}ミセル 400 μg/kg を静脈内投与した。その結果、投与した全てのマウスに副作用は認められなかった。この結果から、当該ドキソルビシン含有医薬組成物のLD₅₀は1mg/kg以上であることが予想される。

【0053】

【発明の効果】 本発明によれば、リポソームよりも容易に調製することができ、DDSに適用可能な薬物担体を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】ガングリオシドG_{T1b} 及びSDS のゲル滌過の結果を示す図である。a. はガングリオシドG_{T1b} をセファ

ロース6Bのカラムに適用した場合を示す。b. はSDS をセファデックスG-25のカラムに適用した場合を示す。

【図2】セファロース6Bによる市販のガングリオシド混合物のゲル滌過の結果を示す図である。

【符号の説明】

- 市販のガングリオシド混合物濃度 100 μM
- 市販のガングリオシド混合物濃度 12.5 μM

【図3】セファロース6Bによる市販のガングリオシド混合物とG_{M1}の混合物のゲル滌過の結果を示す図である。

【符号の説明】

- G_{M1} 100 μM
- G_{M1} 100 μM + ガングリオシド混合物 100 μM
- G_{M1} 100 μM + ガングリオシド混合物 50 μM
- G_{M1} 50 μM + ガングリオシド混合物 100 μM

【図4】ガングリオシドミセル及びリポソームへのスーダンIII の封入を示す図である。横軸はスーダンIII 対ガングリオシド又は卵PCのモル比を示す。縦軸はガングリオシド 100分子又は卵PC 100分子当たりに封入されたスーダンIII 分子の数を示す。

【符号の説明】

- ガングリオシドミセル
- リポソーム

【図5】ガングリオシドミセル及びリポソームへのドキソルビシンの封入を示す図である。横軸はドキソルビシン対ガングリオシド又は卵PCのモル比を示す。縦軸はガングリオシド 100分子又は卵PC 100分子当たりに封入されたドキソルビシン分子の数を示す。

【符号の説明】

- ガングリオシドミセル
- リポソーム

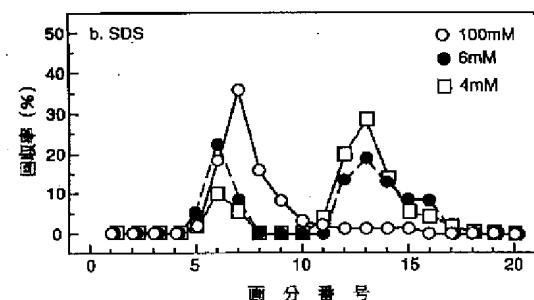
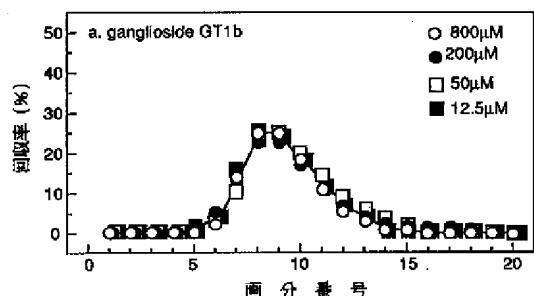
【図6】トレーサーとしての [³H] コレステリルヘキサデシルエーテルの放射能により観察されたガングリオシドG_{M1}によるドキソルビシン封入ガングリオシドミセル及びリポソームの臓器分布を示す図である。記号は3回の測定の平均値を示す。

【符号の説明】

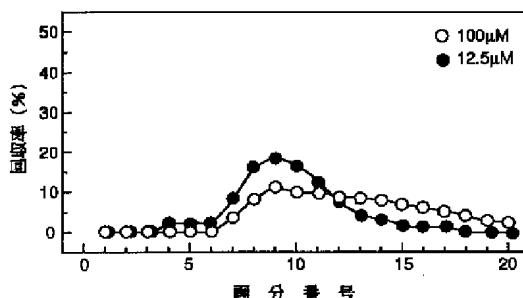
- ガングリオシドミセルについての合計
- ガングリオシドミセルについての肝臓
- △ ガングリオシドミセルについての血液
- ◇ ガングリオシドミセルについての脾臓
- ▽ ガングリオシドミセルについての肺及び脳
- リポソームについての合計
- リポソームについての肝臓
- ▲ リポソームについての血液
- ◆ リポソームについての脾臓
- ▼ リポソームについての肺及び脳

【図7】セファロース6Bによる市販の純粋なガングリオシドの混合物のゲル滌過の結果を示す図である。

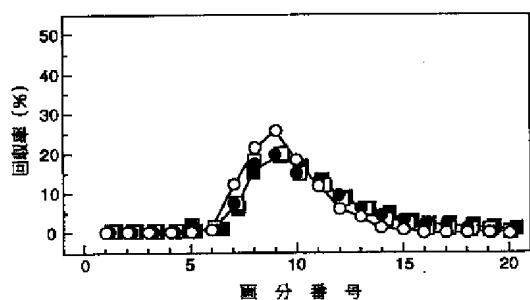
【図1】



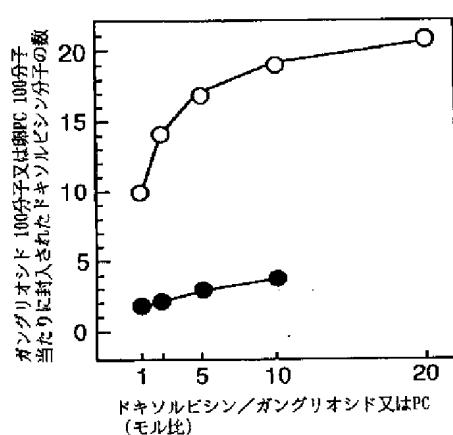
【図2】



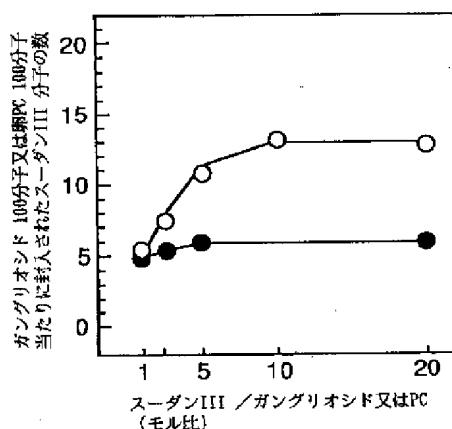
【図3】



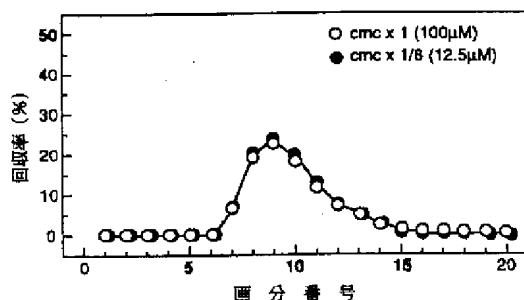
【図5】



【図4】



【図7】



【図6】

